

23374
PCT

WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales Büro



INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation⁷ :

G01N 33/53

A2

(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 00/49407

(43) Internationales
Veröffentlichungsdatum:

24. August 2000 (24.08.00)

(21) Internationales Aktenzeichen:

PCT/EP00/01214

(22) Internationales Anmeldedatum: 15. Februar 2000 (15.02.00)

(30) Prioritätsdaten:

199 06 352.4 17. Februar 1999 (17.02.99) DE
199 39 208.0 18. August 1999 (18.08.99) DE

(71)(72) Anmelder und Erfinder: HENNES, Kilian [DE/DE];
Blarerstrasse 56, D-78462 Konstanz (DE).

(74) Anwälte: HIEBSCH, Gerhard, F. usw.; Hiebsch Peege
Behrmann, Heinrich-Weber-Platz 1, D-78224 Singen
(DE).

(81) Bestimmungsstaaten: AE, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB,
BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, EE,
ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP,
KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA,
MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU,
SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG,
US, UZ, VN, YU, ZA, ZW, ARIPO Patent (GH, GM, KE,
LS, MW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), eurasisches Patent
(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches
Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR,
IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI Patent (BF, BJ, CF,
CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Veröffentlicht

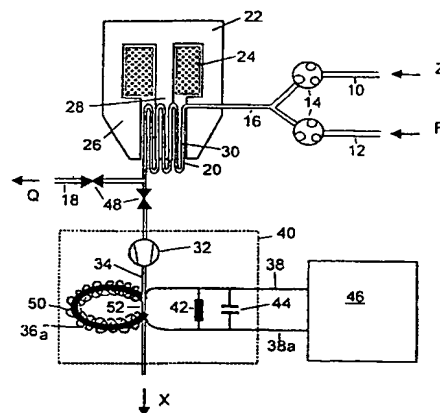
Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu
veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.

(54) Title: METHOD FOR REPRESENTING BIOLOGICALLY ACTIVATED INDUCTANCE-ALTERING PARTICLES AND DEVICE
FOR CARRYING OUT THE METHOD

(54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUM DARSTELLEN VON BIOLOGISCH AKTIVIERTEN INDUKTIVITÄTSÄNDERNDEN PAR-
TIKELN SOWIE VORRICHTUNG DAFÜR

(57) Abstract

According to the inventive method for representing biologically activated inductance-altering particles, especially ferromagnetic or superparamagnetic particles, monovalent primary antibodies are mixed with inductance-altering particles in excess, the latter being coated with secondary antibodies. Aggregated particles are then separated by partial sedimentation, said aggregated particles consisting of a monovalent primary antibody and antibody-coated inductance-altering partial particles. According to a further method, viruses are mixed with ferromagnetic particles in excess, the latter being coated with antibodies that target the sheathing proteins of the viruses, and aggregated particles are separated by partial sedimentation, said aggregated particles consisting of a virus and antibody-coated inductance-altering partial particles. A detecting and counting device for suspended biological microparticles in liquid samples has a delivery line (16) for a sample to be measured which is configured as a measuring line (34) and surrounded by a metal coil which is configured as a measuring coil (36a). The measuring coil is connected to a device (46) for exciting oscillation and measuring resonance events. The metal coil (36a) is placed around a core (50) which is bent approximately into a C shape and which has a gap (52) through which the measuring line (34) is guided.



(57) Zusammenfassung

Bei einem Verfahren für die Darstellung von biologisch aktivierten induktivitätsändernden – insbesondere ferromagnetischen bzw. superparamagnetischen – Partikeln werden monovalente primäre Antikörper mit induktivitätsändernden Partikeln im Überschuss gemischt, welche mit sekundären Antikörpern beschichtet sind, und anschliessend mittels partieller Sedimentation aggregierte Partikel abgetrennt; diese bestehen aus einem monovalenten primären Antikörper und antikörper-beschichteten induktivitätsändernden Teilpartikeln. Zudem werden bei einem weiteren Verfahren Viren mit ferromagnetischen Partikeln im Überschuss gemischt, welche mit gegen die Hüllproteine der Viren gerichteten Antikörpern beschichtet sind, und anschliessend mittels partieller Sedimentation aggregierte Partikel abgetrennt; diese bestehen aus einem Virus und antikörperbeschichteten induktivitätsändernden Teilpartikeln. Bei einer Vorrichtung zum Nachweis und Zählen für suspendierte biologische Mikropartikel in flüssigen Proben ist eine Förderleitung (16) für eine zu messende Probe als Messleitung (34) von einer Metallspule als Messspule (36a) umgeben und diese an eine Einrichtung (46) zum Anregen der Schwingung und Messen von Resonanzereignissen angeschlossen; die Metallspule (36a) ist um einen etwa C-förmig gebogenen Kern (50) gelegt und dieser weist einen Spalt (52) auf, durch den die Messleitung (34) geführt ist.

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss der PCT veröffentlichen.

| | | | | | | | |
|----|------------------------------|----|-----------------------------------|----|---|----|--------------------------------|
| AL | Albanien | ES | Spanien | LS | Lesotho | SI | Slowenien |
| AM | Armenien | FI | Finnland | LT | Litauen | SK | Slowakei |
| AT | Österreich | FR | Frankreich | LU | Luxemburg | SN | Senegal |
| AU | Australien | GA | Gabun | LV | Lettland | SZ | Swasiland |
| AZ | Aserbaidschan | GB | Vereinigtes Königreich | MC | Monaco | TD | Tschad |
| BA | Bosnien-Herzegowina | GE | Georgien | MD | Republik Moldau | TG | Togo |
| BB | Barbados | GH | Ghana | MG | Madagaskar | TJ | Tadschikistan |
| BE | Belgien | GN | Guinea | MK | Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien | TM | Turkmenistan |
| BF | Burkina Faso | GR | Griechenland | ML | Mali | TR | Türkei |
| BG | Bulgarien | HU | Ungarn | MN | Mongolei | TT | Trinidad und Tobago |
| BJ | Benin | IE | Irland | MR | Mauretanien | UA | Ukraine |
| BR | Brasilien | IL | Israel | MW | Malawi | UG | Uganda |
| BY | Belarus | IS | Island | MX | Mexiko | US | Vereinigte Staaten von Amerika |
| CA | Kanada | IT | Italien | NE | Niger | UZ | Usbekistan |
| CF | Zentralafrikanische Republik | JP | Japan | NL | Niederlande | VN | Vietnam |
| CG | Kongo | KE | Kenia | NO | Norwegen | YU | Jugoslawien |
| CH | Schweiz | KG | Kirgisistan | NZ | Neuseeland | ZW | Zimbabwe |
| CI | Côte d'Ivoire | KP | Demokratische Volksrepublik Korea | PL | Polen | | |
| CM | Kamerun | KR | Republik Korea | PT | Portugal | | |
| CN | China | KZ | Kasachstan | RO | Rumänien | | |
| CU | Kuba | LC | St. Lucia | RU | Russische Föderation | | |
| CZ | Tschechische Republik | LI | Liechtenstein | SD | Sudan | | |
| DE | Deutschland | LK | Sri Lanka | SE | Schweden | | |
| DK | Dänemark | LR | Liberia | SG | Singapur | | |
| EE | Estland | | | | | | |

BESCHREIBUNG

5 Verfahren zum Darstellen von biologisch aktivierten induktivitätsändernden Partikeln sowie Vorrichtung dafür

Die Erfindung betrifft ein Verfahren für die Darstellung von biologisch aktivierten induktivitätsändernden -- insbesondere ferromagnetischen bzw. superparamagnetischen -- Partikeln. Zudem betrifft die Erfindung eine Vorrichtung zum Nachweis und Zählen von suspendierten biologischen Mikropartikeln in flüssigen Proben, insbesondere zum Durchführen des genannten Verfahrens.

15 Das Zählen von Bakterien, Blutzellen oder Zellbestandteilen in wässrigen Lösungen erfolgt bisher mittels Durchflussszytometer oder Coultercounter. Hier werden die entsprechenden Partikel gefärbt und anhand von optischen Signalen identifiziert oder durch kapazitive Messungen gezählt.

In Kenntnis dieser Gegebenheiten hat sich der Erfinder das Ziel gesetzt, derartige Messungen zu vereinfachen.

25 Zur Lösung dieser Aufgabe führt die Lehre des unabhängigen Anspruches; die Unteransprüche geben günstige Weiterbildungen an. Zudem fallen in den Rahmen der Erfindung alle Kombinationen aus zumindest zwei der in der Beschreibung, der Zeichnung und/oder den Ansprüchen offenbarten Merkmalen.

35 Erfindungsgemäß werden monovalente primäre Antikörper mit induktivitätsändernden, vor allem ferromagnetischen bzw. superparamagnetischen, Partikeln in mehrfachem Überschuss gemischt, welche mit sekundären Antikörpern beschichtet sind; anschließend werden mittels partieller Sedimentation in einer Zentrifuge aggregierte Partikel abgetrennt, die aus einem monovalenten primären Antikörper und antikörper-

beschichteten ferromagnetischen Teilpartikeln bestehen. Anstelle primärer Antikörper können auch Viren oder Gensonden verwendet werden, gegen deren Hüllproteine bzw. Spacermoleküle die sekundären Antikörper gerichtet sind.

5

Nach einem weiteren Merkmal der Erfindung können die biologischen Partikel zum Nachweis bzw. zum Zählen immunologisch, phagologisch oder molekularbiologisch mit aggregierten Partikeln verbunden werden, die beim anschließenden Durchströmen einer Metallspule -- insbesondere des Spaltes einer C-förmigen Metallspule mit ferromagnetischem Kern -- messbare und zählbare Induktivitätsänderungen auslösen.

Auch hat es sich als günstig erwiesen, induktivitätsändernde Partikel vor dem Durchströmen der Metallspule mittels Elektromagnet in einer Kunststoffkapillare festzuhalten und dort mit den in die Kapillare einströmenden biologischen Partikeln zu verbinden, während die Probe, in welcher diese enthalten waren, aus der Kapillare herausgeführt wird. Zudem sollen durch die Metallspule als Teil eines elektronischen Schwingkreises zählbare Änderungen der Eigenschwingfrequenz erzeugt werden.

Um den apparativen Aufwand bei der optischen Messung zu umgehen und eine höhere Spezifität gegenüber der kapazitiven Messung zu erreichen, wird also für den Nachweis des einzelnen Partikels ein geändertes Messprinzip eingesetzt: Die Messung der Induktivitätsänderung einer Mikrospule aus Metall. Da biologische Partikel aber eine Permeabilitätskonstante μ von annähernd 1 haben, müssen diese zum Nachweis und zur Zählung mittels Spule zuvor mit induktivitätsändernden Substanzen markiert werden. Diese Markierung geschieht durch die immunologische, phagologische oder molekularbiologische Ankopplung von ferromagnetischen bzw. superparamagnetischen Partikeln, welche monovalent entweder mit Antikörpern, mit Virus-Andockmolekülen oder mit Gensonden an Spacermolekülen verbunden sind.

Im Rahmen der Erfindung liegt eine Vorrichtung der eingangs genannten Art mit einer Förderleitung für eine zu messende Probe, die als Messleitung von einer Metallspule als Messspule umgeben ist, welche ihrerseits an eine Einrichtung zum Anregen der Schwingung und Messen von Resonanzereignissen angeschlossen ist.

In einer besonderen Ausgestaltung ist diese Metallspule um einen etwa C-förmig gebogenen Kern gelegt, dessen Enden einen Spalt begrenzen; durch diesen Spalt ist die Messleitung gelegt.

Nach einem weiteren Merkmal der Erfindung ist die Förderleitung an eine Einrichtung mit Kapillaren -- insbesondere mit Teflonkapillaren -- angeschlossen; letztere sind einem Elektromagneten zugeordnet und können in einem von einem Polschuh umgebenen Raum angeordnet sein.

Vorteilhafterweise ist zwischen den Elektromagneten und einem Ventil der Förderleitung eine Zweigleitung für überschüssige Proben vorgesehen. Zudem können jener Einrichtung zum Anregen der Schwingung und Messen von Resonanzereignissen zur Metallspule hin wenigstens ein Widerstand sowie ein Kondensator vorgeordnet sein.

Die Messspule, eine ihr vorgeordnete Piezopumpe und ein nachgeordneter Widerstand bzw. Kondensator sollen erfindungsgemäß Teile einer mikrosystemtechnischen Einheit sein.

Die Ankopplung der ferromagnetischen Marker geschieht also in der Vorrichtung, welche gleichzeitig eine Anreicherung der zu zählenden Partikel ermöglicht: Die Marker werden in jener Teflonkapillare mittels eines Elektromagneten als Sorptions-Schicht festgehalten, bis die gesamte Probe in die Kapillare gepumpt wurde und gleichzeitig die überschüssige Probe aus der Kapillare herausgelaufen ist. Hierauf wird der Magnet ausgeschaltet, damit die Marker frei diffundieren und die Oberfläche der biologischen Partikel

- sättigen können. Dann wird der Kapillaren-Inhalt mit der erwähnten piezoelektrischen Pumpe durch die Metallspule gepumpt, insbesondere durch den Spalt der C-förmig gestalteten Metallspule mit ferromagnetischem Kern. Die Metallspule wurde als Spirale auf eine Leiterplatte geätzt und ist mit Kondensator und Widerstand als Schwingkreis geschaltet. Der Schwingkreis wird mit einer Frequenz ange-
regt, die derjenigen Eigenschwingfrequenz entspricht, welche generiert wird, wenn sich ein durchschnittlich markierter biologischer Mikropartikel in der Spule bzw. im Spalt befindet. Dadurch entsteht im Schwingkreis immer dann eine Resonanzschwingung, wenn ein entsprechender Mikropartikel durch die Spule tritt.
- Ein Beispiel für die Anwendung dieses Verfahrens ist der Nachweis von Kolibakterien in Wasserproben. Hierzu werden monovalente primäre E.-coli-spezifische Antikörper mit an magnetische Beads gekoppelten sekundären Antikörpern konjugiert. Die Suspension dieser Konjugate wird in die Teflon-Kapillare gepumpt und mittels Elektromagnet dort fixiert. Beim Durchströmen der Kapillare mit der zu untersuchenden Wasserprobe werden Kolibakterien über die primären Antikörper an den Konjugaten festgehalten. Nach dem Abschalten des Magneten kann die Suspension von magnetisch markierten Kolibakterien durch die Messspule bzw. den Spalt der Metallspule gepumpt werden. Die Anzahl der Resonanz-Ereignisse im angeschlossenen Schwingkreis entspricht der Anzahl der Kolibakterien in der ursprünglichen Wasserprobe. Durch den Einsatz dieses Gerätes und der entsprechenden Konjugate ist es möglich, ohne den aufwendigen Einsatz der Durchflusszytometrie Bakterien automatisch zu zählen. Des weiteren ist es möglich, mit dieser Messmethode eine Miniatursierung des Nachweisgerätes zu erreichen.

Mit der beschriebenen Technik werden Partikel wie Bakterien, Zellen oder Zellbestandteile in wässrigen Lösungen nachgewiesen und gezählt. Diese Technik ermöglicht eine Miniaturisierung des automatischen Partikelzählverfahrens.

5 Dazu werden die Partikel vor der Messung durch die Reaktion mit monovalenten antikörper- bzw. virenbeschichteten ferromagnetischen Partikeln markiert. Die induktive Messung beruht auf dem Passieren der mit den biologischen Partikeln aggregierten ferromagnetischen Partikel durch die in be-

10 schriebener Weise gestaltete Mikrospule eines elektronischen Schwingkreises. Die beim Passieren auftretenden Resonanzereignisse werden gezählt.

Die erfindungsgemäße Vorrichtung kann in der Medizin, Mikrobiologie und Hygiene eingesetzt werden, beispielsweise

15 zum Auszählen von Blutzellen; es können ökologisch relevante Mikroorganismen ausgezählt oder krankheitserregende Keime nachgewiesen werden.

Weitere Vorteile, Merkmale und Einzelheiten der Erfindung ergeben sich aus der nachfolgenden Beschreibung eines bevorzugten Ausführungsbeispiels sowie anhand der Zeichnung; diese zeigt in

5

Fig. 1, 3: jeweils ein Schema zu einem erfindungsgemäßen Verfahren;

10

Fig. 2: ein Detail der Fig. 1, 3 in schematisierter Schrägsicht.

Vor einem Verfahren zum Nachweis von Kolibakterien in einer durch eine Leitung 10 zugeführten Wasserprobe Z werden monovalente primäre E.-coli-spezifische Antikörper mit an magnetische Beads gekoppelten sekundären Antikörpern konjugiert. Die Leitung für die monovalenten magnetischen Partikel F ist mit 12 bezeichnet. Beide Leitungen 10, 12 enthalten Schlauchpumpen 14 und vereinigen sich nach diesen zu einer gemeinsamen Förderleitung 16.

20

Das Reagenz mit ferromagnetischen, biologisch aktivierten Partikeln wird über die Leitungen 12 und 16 in eine Teflonkapillare 20 gepumpt und dort mittels eines Elektromagneten 22 fixiert, dessen Magnetspule mit 24 bezeichnet und dem die Z-förmig aufgewickelte Teflonkapillare 20 in einem konzentrischen Polschuh 26 zugeordnet ist. Dieser begrenzt mit einem von ihm in Radialabstand umgebenen Polstift 28 einen Ringraum 30 für die Teflonkapillare.

30 Beim Durchströmen der Kapillare 20 mit der zu untersuchenden Wasserprobe Z werden Kolibakterien als zu zählende biologische Partikel über die primären Antikörper an den ferromagnetischen Konjugaten festgehalten. Nach dem Abschalten des Elektromagneten 22 kann die Suspension von magnetisch markierten Kolibakterien dank einer Piezopumpe 32 in einer Messleitung 34 durch eine geätzte Metallspule als Messspule 36 einer mikrosystemtechnischen Einheit 40 transportiert

werden. Aus dieser werden die gezählten Partikel in Pfeilrichtung X ausgetragen.

Im Ausführungsbeispiel der Fig. 3 wird jene Suspension in der Messleitung 35 durch den Spalt 52 eines ferromagnetischen, C-förmig gebogenen Kerns 50 einer Messspule 36_a transportiert.

Die freien Enden 38, 38_a der Messspule 36, 36_a sind -- nach einem Widerstand 42 und einem Kondensator 44 -- an eine Einrichtung 46 zum Anregen der Schwingung und zum Messen von Resonanzereignissen angeschlossen; dort erfolgt eine Umwandlung in Zählimpulse.

Die Anzahl der Resonanzereignisse im angeschlossenen Schwingkreis entspricht der Anzahl der Kolibakterien in der ursprünglichen Wasserprobe Z.

Zwischen der Teflonkapillare 20 und der Piezopumpe 32 ist ein -- ein Ventil 48 enthaltender -- Leitungsabzweig 18 für überschüssige Probeanteile Q vorgesehen, dem in der Förderleitung 16 ein Ventil 48 nachgeschaltet ist.

PATENTANSPRÜCHE

1. Verfahren für die Darstellung von biologisch aktivierten induktivitätsändernden, insbesondere ferromagnetischen bzw. superparamagnetischen, Partikeln, dadurch gekennzeichnet,
- dass monovalente primäre Antikörper mit induktivitätsändernden Partikeln im Überschuss gemischt werden, welche mit sekundären Antikörpern beschichtet sind, und anschließend mittels partieller Sedimentation aggregierte Partikel abgetrennt werden, die aus einem monovalenten primären Antikörper und antikörper-beschichteten induktivitätsändernden Teilpartikeln bestehen.
2. Verfahren für die Darstellung von biologisch aktivierten induktivitätsändernden, insbesondere ferromagnetischen bzw. superparamagnetischen, Partikeln, dadurch gekennzeichnet, dass Viren mit induktivitätsändernden Partikeln im Überschuss gemischt werden, welche mit gegen die Hüllproteine der Viren gerichteten Antikörpern beschichtet sind, und anschließend mittels partieller Sedimentation aggregierte Partikel abgetrennt werden, die aus einem Virus und antikörper-beschichteten induktivitätsändernden Teilpartikeln bestehen.
3. Verfahren für die Darstellung von biologisch aktivierten induktivitätsändernden, insbesondere ferromagnetischen bzw. superparamagnetischen, Partikeln, dadurch gekennzeichnet, dass spacermolekül-gekoppelte Oligonukleotid-Gensonden mit induktivitätsändernden Partikeln im Überschuss gemischt werden, welche mit gegen die Spacermoleküle gerichteten Antikörpern beschichtet sind, und anschließend mittels partieller Sedimenta-

tion aggregierte Partikel abgetrennt werden, die aus einer Gensonde und antikörper-beschichteten induktivitätsändernden Teilpartikeln bestehen.

- 5 4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, dass biologische Partikel zum Nachweis bzw. zur Zählung immunologisch, phagologisch oder molekularbiologisch mit den aggregierten Partikeln verbunden werden, die als Marker beim anschließenden
10 Durchströmen einer Metallspule meßbare und zählbare Induktivitätsänderungen auslösen.
- 15 5. Verfahren nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, dass die Marker beim Durchströmen des Spaltes an einem etwa C-förmig gebogenen Kern einer Metallspule messbare und zählbare Induktivitätsänderungen auslösen.
- 20 6. Verfahren nach Anspruch 4 oder 5, dadurch gekennzeichnet, dass induktivitätsändernde Partikel vor dem Durchströmen der Metallspule mittels Elektromagnet in einer Kunststoffkapillare festgehalten und dort mit den in die Kapillare einströmenden biologischen Partikeln verbunden werden, während die sie enthaltende Probe aus der Kapillare herausgeführt wird.
- 25 7. Verfahren nach einem der Ansprüche 4 bis 6, dadurch gekennzeichnet, dass durch die Metallspule als Teil eines elektronischen Schwingkreises beim Durchströmen der induktivitätsändernden Partikel zählbare Änderungen der Eigenschwingfrequenz erzeugt werden.
- 30 8. Vorrichtung zum Nachweis und Zählen für suspendierte biologische Partikel in flüssigen Proben, insbesondere Vorrichtung zum Durchführen der Verfahren nach
35 wenigstens einem der vorausgehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass eine Förderleitung (16) für eine zu messende Probe als Messleitung (34) von einer Metallspule als Messspule (36, 36_a) umgeben und diese an

eine Einrichtung (46) zum Anregen der Schwingung und Messen von Resonanzereignissen angeschlossen ist.

- 5 9. Vorrichtung nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, dass die Metallspule (36_a) um einen etwa C-förmig gebogenen Kern (50) gelegt und dieser einen Spalt (52) aufweist, durch den die Messleitung (34) geführt ist.
- 10 10. Vorrichtung nach Anspruch 8 oder 9, dadurch gekennzeichnet, dass die Förderleitung (16) an eine Einrichtung mit Kapillaren (20), insbesondere Teflonkapillaren, angeschlossen ist sowie letztere einem Elektromagneten (22) zugeordnet sind.
- 15 11. Vorrichtung nach Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, dass die Kapillare/n (20) in einem von einem Polschuh (24) umgebenen Raum (30) angeordnet sind.
- 20 12. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 8 bis 11, dadurch gekennzeichnet, dass zwischen den Elektromagneten (22) und einem Ventil (48) der Förderleitung (16) eine Zweigleitung (18) für überschüssige Proben (Q) angeordnet ist.
- 25 13. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 8 bis 12, dadurch gekennzeichnet, dass der Einrichtung (46) zum Anregen der Schwingung und Messen von Resonanzereignissen zur Metallspule (36, 36_a) hin wenigstens ein Widerstand (42) sowie ein Kondensator (44) vorgeordnet sind.

30

14. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 8 bis 13, dadurch gekennzeichnet, dass die Messspule (36, 36_a) mit vorgeordneter Piezopumpe (32) und nachgeordnetem Widerstand (42) bzw. Kondensator (44) Teile einer mikro-
5 systemtechnischen Einheit (40) sind.

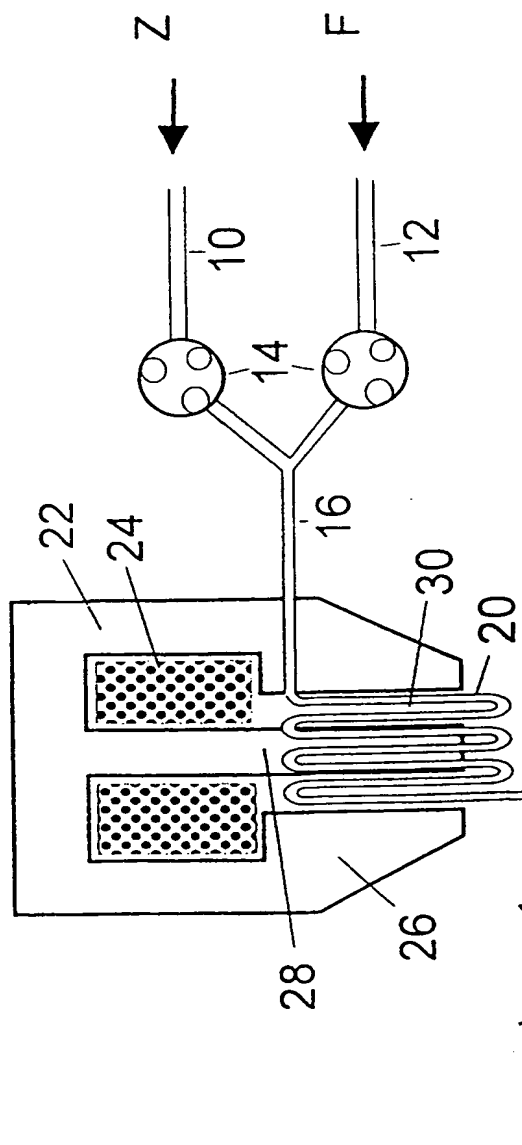
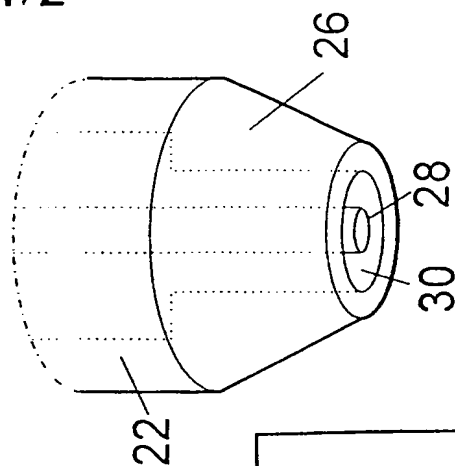


Fig. 1

1/2

Fig. 2



2/2

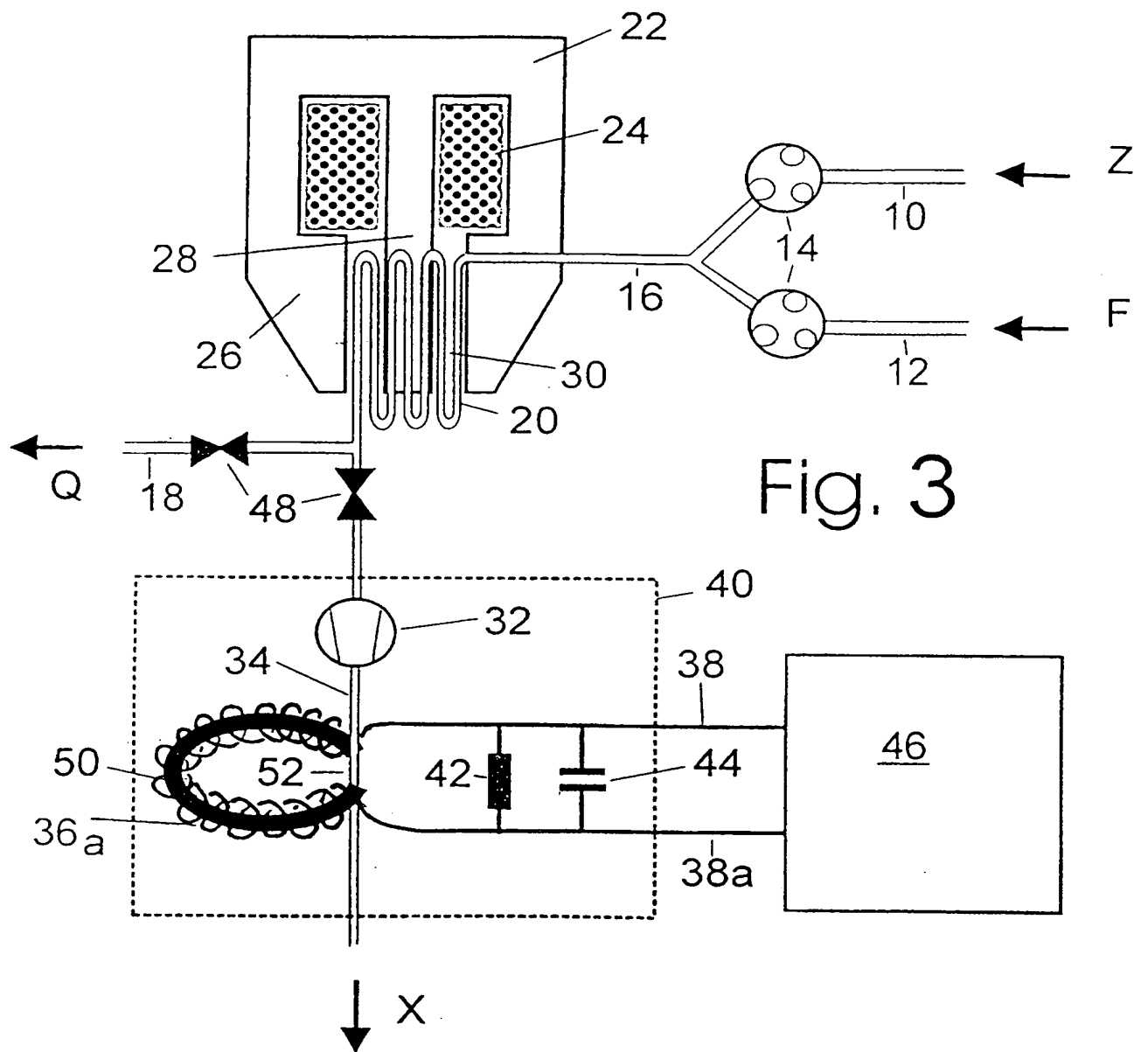


Fig. 3

THIS PAGE BLANK (CONT.)

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
24. August 2000 (24.08.2000)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 00/49407 A3

(51) Internationale Patentklassifikation⁷: G01N 33/533.
33/543, 27/72

(74) Anwälte: HIEBSCH, Gerhard, F. usw.; Hiebsch Peege
Behrmann, Heinrich-Weber-Platz 1, D-78224 Singen (DE).

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP00/01214

(81) Bestimmungsstaaten (national): AE, AL, AM, AT, AU,
AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE,
DK, DM, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID,
IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT,
LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL,
PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ,
UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(22) Internationales Anmeldedatum:
15. Februar 2000 (15.02.2000)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
199 06 352.4 17. Februar 1999 (17.02.1999) DE
199 39 208.0 18. August 1999 (18.08.1999) DE

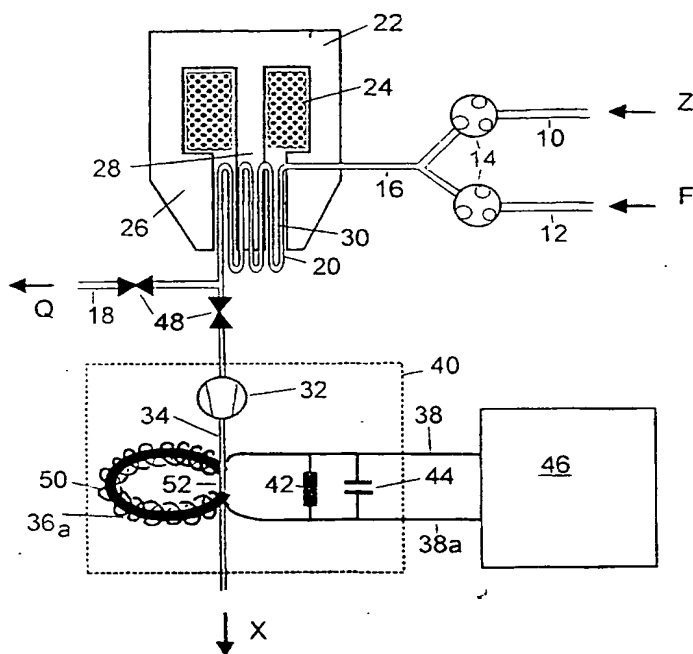
(84) Bestimmungsstaaten (regional): ARIPO-Patent (GH,
GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), eurasisches
Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM),
europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI,
FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI-Patent
(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE,
SN, TD, TG).

(71) Anmelder und
(72) Erfinder: HENNES, Kilian [DE/DE]; Blarerstrasse 56,
D-78462 Konstanz (DE).

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

(54) Title: METHOD FOR REPRESENTING BIOLOGICALLY ACTIVATED INDUCTANCE-ALTERING PARTICLES AND
DEVICE FOR CARRYING OUT THE METHOD

(54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUM DARSTELLEN VON BIOLOGISCH AKTIVIERTEN INDUKTIVITÄTSÄNDERNDEN
PARTIKELN SOWIE VORRICHTUNG DAFÜR



(57) Abstract: According to the inventive method for representing biologically activated inductance-altering particles, especially ferromagnetic or superparamagnetic particles, monovalent primary antibodies, viruses or DNA probes are mixed with inductance-altering particles in excess, the latter being coated with secondary antibodies. Aggregated particles are then separated by partial sedimentation, said aggregated particles consisting of a monovalent primary antibody and antibody-coated inductance-altering partial particles. A detecting and counting device for suspended biological microparticles in liquid samples has a delivery line (16) for a sample to be measured which is configured as a measuring line (34) and surrounded by a metal coil which is configured as a measuring coil (36a). The measuring coil is connected to a device (46) for exciting oscillation and measuring resonance events. The metal coil (36a) is placed around a core (50) which is bent approximately into a C shape and which has a gap (52) through which the measuring line (34) is guided.

(57) Zusammenfassung: Bei einem Verfahren für die Darstellung von biologisch aktivierten induktivitätsändernden - insbesondere ferromagnetischen bzw. superparamagnetischen - Partikeln werden monovalente

primäre Antikörper, Viren oder Gensonden mit induktivitätsändernden Partikeln im Überschuss gemischt, welche mit sekundären Antikörpern beschichtet sind, und anschliessend mittels partieller Sedimentation aggregierte Partikel abgetrennt;

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

WO 00/49407 A3

**Veröffentlicht:**

— mit internationalem Recherchenbericht

(88) Veröffentlichungsdatum des internationalen**Recherchenberichts:**

7. Februar 2002

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

diese bestehen aus einem monovalenten primären Antikörper und antikörper-beschichteten induktivitätsändernden Teilpartikeln. Bei einer Vorrichtung zum Nachweis und Zählen für suspendierte biologische Mikropartikel in flüssigen Proben ist eine Förderleitung (16) für eine zu messende Probe als Messleitung (34) von einer Metallspule als Messspule (36a) umgeben und diese an eine Einrichtung (46) zum Anregen der Schwingung und Messen von Resonanzereignissen angeschlossen; die Metallspule (36a) ist um einen etwa C-förmig gebogenen Kern (50) gelegt und dieser weist einen Spalt (52) auf, durch den die Messleitung (34) geführt ist.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Internat Application No

PCT/EP 00/01214

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 G01N33/533 G01N33/543 G01N27/72

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 G01N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ, BIOSIS, CHEM ABS Data, EMBASE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category * | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|------------|---|-----------------------|
| E | DE 199 46 656 A (HENNES KILIAN) 24 August 2000 (2000-08-24) the whole document | 1-14 |
| P,X | DE 199 06 352 A (HENNES KILIAN DR) 22 July 1999 (1999-07-22) the whole document | 1-14 |
| P,X | WO 99 27369 A (SIMMONDS MICHAEL BANCROFT ;QUANTUM DESIGN INC (US)) 3 June 1999 (1999-06-03) the whole document | 8-14 |
| P,X | WO 99 27367 A (KNOLL MEINHARD) 3 June 1999 (1999-06-03) claims | 1-14 |
| -/- | | |



Further documents are listed in the continuation of box C.



Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

T later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

X document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

Y document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

& document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

4 September 2000

Date of mailing of the international search report

15/09/2000

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5618 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Routledge, B

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/EP 00/01214

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category * | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|------------|---|-----------------------|
| X | WO 98 52043 A (ABBOTT LAB) 19 November 1998 (1998-11-19) claims 1-3, 10-14, 21-25, 32-36, 43-45, 51-53 page 32, line 19 - page 33, line 16 | 1-14 |
| X | DE 196 15 254 A (DIAGNOSTIKFORSCHUNG INST) 23 October 1997 (1997-10-23) claims 1-7 column 4, line 12 - line 16; figure 4 column 11, line 50 - column 12, line 8 | 1-14 |
| X | WO 97 20074 A (MANDECKI) 5 June 1997 (1997-06-05) claims page 11, line 1 - line 16 page 15, line 30 - page 16, line 2; figure 13 | 1-14 |
| X | WO 97 20073 A (MANDECKI) 5 June 1997 (1997-06-05) claims page 8, paragraph 2 page 12, paragraph 3; figure 7 | 1-14 |
| X | WO 96 23227 A (SCHERING AG) 1 August 1996 (1996-08-01) claims page 11, line 22 - page 12, line 10 | 1-14 |
| X | WO 96 03653 A (SILICA GEL) 8 February 1996 (1996-02-08) claims 1-12 page 14, paragraph 2 | 1-7 |
| X | WO 93 19371 A (ABBOTT LAB) 30 September 1993 (1993-09-30) claims page 9, line 9 - line 23 page 22, line 24 - line 31 | 1-7 8-14 |
| X | WO 93 19370 A (ABBOTT LAB) 30 September 1993 (1993-09-30) claims 1, 10-19, 23-25, 27 page 9, line 33 - page 19, line 10 page 23, line 24 - line 31 | 1-7 8-14 |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

information on patent family members

Interr: 1st Application No

PCT/EP 00/01214

| Patent document cited in search report | Publication date | Patent family member(s) | Publication date |
|---|---------------------|---|--|
| DE 19946656 A | 24-08-2000 | DE 19906352 A WO 0049407 A | 22-07-1999 24-08-2000 |
| DE 19906352 A | 22-07-1999 | DE 19946656 A WO 0049407 A | 24-08-2000 24-08-2000 |
| WO 9927369 A | 03-06-1999 | US 6046585 A AU 9207998 A | 04-04-2000 15-06-1999 |
| WO 9927367 A | 03-06-1999 | DE 19751706 A DE 19822123 A | 02-06-1999 25-11-1999 |
| WO 9852043 A | 19-11-1998 | US 5998224 A EP 0981749 A | 07-12-1999 01-03-2000 |
| DE 19615254 A | 23-10-1997 | AU 718523 B AU 2885497 A BR 9708780 A CA 2250087 A CN 1216613 A CZ 9803338 A WO 9740377 A DE 29780349 U EP 0898706 A HU 9901377 A NO 984856 A PL 328792 A SK 143598 A | 13-04-2000 12-11-1997 04-01-2000 30-10-1997 12-05-1999 14-04-1999 30-10-1997 01-04-1999 03-03-1999 30-08-1999 04-12-1998 15-02-1999 07-05-1999 |
| WO 9720074 A | 05-06-1997 | US 5641634 A AU 1141597 A CA 2238696 A EP 0871777 A US 6051377 A US 6001571 A | 24-06-1997 19-06-1997 05-06-1997 21-10-1998 18-04-2000 14-12-1999 |
| WO 9720073 A | 05-06-1997 | US 5736332 A AU 1061597 A CA 2238645 A EP 0864000 A JP 2000502886 T US 6046003 A | 07-04-1998 19-06-1997 05-06-1997 16-09-1998 14-03-2000 04-04-2000 |
| WO 9623227 A | 01-08-1996 | DE 19503664 A AT 188778 T AU 703069 B AU 4714996 A CA 2211364 A CN 1176001 A DE 59604171 D EP 0805983 A ES 2142569 T FI 973122 A HU 9702463 A JP 10513551 T NO 973444 A NZ 301665 A PT 805983 T | 01-08-1996 15-01-2000 11-03-1999 14-08-1996 01-08-1996 11-03-1998 17-02-2000 12-11-1997 16-04-2000 25-07-1997 28-04-1998 22-12-1998 25-07-1997 29-03-1999 28-04-2000 |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 00/01214

| Patent document cited in search report | Publication date | Patent family member(s) | Publication date |
|---|---------------------|----------------------------|---------------------|
| WO 9623227 A | | US 6027946 A | 22-02-2000 |
| WO 9603653 A | 08-02-1996 | DE 4427821 A | 01-02-1996 |
| | | AT 191086 T | 15-04-2000 |
| | | DE 59508069 D | 27-04-2000 |
| | | EP 0772776 A | 14-05-1997 |
| | | JP 10503281 T | 24-03-1998 |
| | | US 5928958 A | 27-07-1999 |
| WO 9319371 A | 30-09-1993 | AU 661140 B | 13-07-1995 |
| | | AU 3808593 A | 21-10-1993 |
| | | CA 2129044 A | 30-09-1993 |
| | | EP 0631668 A | 04-01-1995 |
| | | JP 2625578 B | 02-07-1997 |
| | | JP 7504987 T | 01-06-1995 |
| WO 9319370 A | 30-09-1993 | AU 3919393 A | 21-10-1993 |
| | | EP 0631669 A | 04-01-1995 |
| | | JP 2625577 B | 02-07-1997 |
| | | JP 7504986 T | 01-06-1995 |
| | | US 5445970 A | 29-08-1995 |
| | | US 5445971 A | 29-08-1995 |

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Intern als Aktenzeichen
PCT/EP 00/01214

| C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN | | |
|--|---|--------------------|
| Kategorie* | Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile | Betr. Anspruch Nr. |
| X | WO 98 52043 A (ABBOTT LAB) 19. November 1998 (1998-11-19) Ansprüche 1-3, 10-14, 21-25, 32-36, 43-45, 51-53 Seite 32, Zeile 19 -Seite 33, Zeile 16 | 1-14 |
| X | DE 196 15 254 A (DIAGNOSTIKFORSCHUNG INST) 23. Oktober 1997 (1997-10-23) Ansprüche 1-7 Spalte 4, Zeile 12 - Zeile 16; Abbildung 4 Spalte 11, Zeile 50 -Spalte 12, Zeile 8 | 1-14 |
| X | WO 97 20074 A (MANDECKI) 5. Juni 1997 (1997-06-05) Ansprüche Seite 11, Zeile 1 - Zeile 16 Seite 15, Zeile 30 -Seite 16, Zeile 2; Abbildung 13 | 1-14 |
| X | WO 97 20073 A (MANDECKI) 5. Juni 1997 (1997-06-05) Ansprüche Seite 8, Absatz 2 Seite 12, Absatz 3; Abbildung 7 | 1-14 |
| X | WO 96 23227 A (SCHERING AG) 1. August 1996 (1996-08-01) Ansprüche Seite 11, Zeile 22 -Seite 12, Zeile 10 | 1-14 |
| X | WO 96 03653 A (SILICA GEL) 8. Februar 1996 (1996-02-08) Ansprüche 1-12 Seite 14, Absatz 2 | 1-7 |
| X | WO 93 19371 A (ABBOTT LAB) 30. September 1993 (1993-09-30) | 1-7 |
| Y | Ansprüche Seite 9, Zeile 9 - Zeile 23 Seite 22, Zeile 24 - Zeile 31 | 8-14 |
| X | WO 93 19370 A (ABBOTT LAB) 30. September 1993 (1993-09-30) | 1-7 |
| Y | Ansprüche 1, 10-19, 23-25, 27 Seite 9, Zeile 33 -Seite 19, Zeile 10 Seite 23, Zeile 24 - Zeile 31 | 8-14 |

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Intern: 100 Aktenzeichen

PCT/EP 00/01214

| Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument | Datum der Veröffentlichung | Mitglied(er) der Patentfamilie | Datum der Veröffentlichung |
|--|-------------------------------|-----------------------------------|-------------------------------|
| DE 19946656 A | 24-08-2000 | DE 19906352 A | 22-07-1999 |
| | | WO 0049407 A | 24-08-2000 |
| DE 19906352 A | 22-07-1999 | DE 19946656 A | 24-08-2000 |
| | | WO 0049407 A | 24-08-2000 |
| WO 9927369 A | 03-06-1999 | US 6046585 A | 04-04-2000 |
| | | AU 9207998 A | 15-06-1999 |
| WO 9927367 A | 03-06-1999 | DE 19751706 A | 02-06-1999 |
| | | DE 19822123 A | 25-11-1999 |
| WO 9852043 A | 19-11-1998 | US 5998224 A | 07-12-1999 |
| | | EP 0981749 A | 01-03-2000 |
| DE 19615254 A | 23-10-1997 | AU 718523 B | 13-04-2000 |
| | | AU 2885497 A | 12-11-1997 |
| | | BR 9708780 A | 04-01-2000 |
| | | CA 2250087 A | 30-10-1997 |
| | | CN 1216613 A | 12-05-1999 |
| | | CZ 9803338 A | 14-04-1999 |
| | | WO 9740377 A | 30-10-1997 |
| | | DE 29780349 U | 01-04-1999 |
| | | EP 0898706 A | 03-03-1999 |
| | | HU 9901377 A | 30-08-1999 |
| | | NO 984856 A | 04-12-1998 |
| | | PL 328792 A | 15-02-1999 |
| | | SK 143598 A | 07-05-1999 |
| WO 9720074 A | 05-06-1997 | US 5641634 A | 24-06-1997 |
| | | AU 1141597 A | 19-06-1997 |
| | | CA 2238696 A | 05-06-1997 |
| | | EP 0871777 A | 21-10-1998 |
| | | US 6051377 A | 18-04-2000 |
| | | US 6001571 A | 14-12-1999 |
| WO 9720073 A | 05-06-1997 | US 5736332 A | 07-04-1998 |
| | | AU 1061597 A | 19-06-1997 |
| | | CA 2238645 A | 05-06-1997 |
| | | EP 0864000 A | 16-09-1998 |
| | | JP 2000502886 T | 14-03-2000 |
| | | US 6046003 A | 04-04-2000 |
| WO 9623227 A | 01-08-1996 | DE 19503664 A | 01-08-1996 |
| | | AT 188778 T | 15-01-2000 |
| | | AU 703069 B | 11-03-1999 |
| | | AU 4714996 A | 14-08-1996 |
| | | CA 2211364 A | 01-08-1996 |
| | | CN 1176001 A | 11-03-1998 |
| | | DE 59604171 D | 17-02-2000 |
| | | EP 0805983 A | 12-11-1997 |
| | | ES 2142569 T | 16-04-2000 |
| | | FI 973122 A | 25-07-1997 |
| | | HU 9702463 A | 28-04-1998 |
| | | JP 10513551 T | 22-12-1998 |
| | | NO 973444 A | 25-07-1997 |
| | | NZ 301665 A | 29-03-1999 |
| | | PT 805983 T | 28-04-2000 |

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Intern. Aktenzeichen

PCT/EP 00/01214

| Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument | Datum der Veröffentlichung | Mitglied(er) der Patentfamilie | Datum der Veröffentlichung |
|--|-------------------------------|-----------------------------------|-------------------------------|
| WO 9623227 A | | US 6027946 A | 22-02-2000 |
| WO 9603653 A | 08-02-1996 | DE 4427821 A | 01-02-1996 |
| | | AT 191086 T | 15-04-2000 |
| | | DE 59508069 D | 27-04-2000 |
| | | EP 0772776 A | 14-05-1997 |
| | | JP 10503281 T | 24-03-1998 |
| | | US 5928958 A | 27-07-1999 |
| WO 9319371 A | 30-09-1993 | AU 661140 B | 13-07-1995 |
| | | AU 3808593 A | 21-10-1993 |
| | | CA 2129044 A | 30-09-1993 |
| | | EP 0631668 A | 04-01-1995 |
| | | JP 2625578 B | 02-07-1997 |
| | | JP 7504987 T | 01-06-1995 |
| WO 9319370 A | 30-09-1993 | AU 3919393 A | 21-10-1993 |
| | | EP 0631669 A | 04-01-1995 |
| | | JP 2625577 B | 02-07-1997 |
| | | JP 7504986 T | 01-06-1995 |
| | | US 5445970 A | 29-08-1995 |
| | | US 5445971 A | 29-08-1995 |

This Page is inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☒ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLORED OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REPERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images
problems checked, please do not report the
problems to the IFW Image Problem Mailbox**

This Page Blank (uspto)